

大鼠不翻转小肠囊模型对三七皂苷 R₁ 吸收的研究

邓震亭^{1,2}, 孟林¹

(1. 天津医科大学基础医学院药理教研室, 天津 300070;
2. 天津中医药大学第一附属医院药剂部, 天津 300193)

[摘要] 目的:通过不翻转小肠囊法研究药物浓度、能量以及小肠上皮组织的 P-蛋白对三七皂苷 R₁ 吸收的影响。方法:在小肠囊中加入不同浓度的三七皂苷 R₁ 溶液,比较不同浓度的三七皂苷 R₁ 的吸收差异;加入代谢抑制剂 2-硝基酚,观察三七皂苷 R₁ 的吸收是否需要能量;观察 P-蛋白抑制剂维拉帕米对三七皂苷 R₁ 吸收的影响。结果:三七皂苷 R₁ 的吸收与浓度呈线性,且需要能量。维拉帕米对三七皂苷 R₁ 的吸收无显著影响。结论:三七皂苷 R₁ 在大鼠肠道内的吸收有被动扩散性,三七皂苷 R₁ 可能不是 P-蛋白的底物。

[关键词] 三七皂苷 R₁; 不翻转小肠囊模型; 吸收; 维拉帕米; 2-硝基酚

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)11-0142-03

Study on Absorption of Notoginsenoside R₁ Using Rat Non-everted Gut Sac

DENG Zhen-ting^{1,2}, MENG Lin¹

(1. Basic Medical College of Tianjin Medical University, Tianjin 300070;
2. First Teaching Hospital of Tianjin University of Tradition Chinese Medicine, Tianjin 300193)

[Abstract] **Objective:** To study the absorption characteristics of notoginsenoside R₁ influenced by density, energy and p-glycoprotein with rat non-everted gut sac system. **Method:** Different concentration of notoginsenoside

[收稿日期] 20101118(013)

[第一作者] 邓震亭, 硕士生, 研究方向: 药理药剂, Tel: 022-27432634, E-mail: dengzt6@163.com

[参考文献]

- [1] 董飞侠, 黄迪, 何立群, 等. III 期慢性肾病肾阳虚证患者尿液代谢组学特征的研究[J]. 中华中医药杂志, 2008, 23(12): 1109.
- [2] 中国高血压防治指南修正委员会. 中国高血压防治指南[M]. 2005 年修订版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 20.
- [3] 国家食品药品监督管理局. 中药新药临床研究指导原则[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002: 73.
- [4] Okuda S, Yanada T, Hanmajima M, et al. KEGG Atlas mapping for global analysis of metabolic pathways[J]. Nucleic Acids Res, 2008, 36: W423.
- [5] 余庆皋. 肌醇磷脂代谢与高血压[J]. 生命的化学, 1991, 11(2): 27.
- [6] 王鹏飞, 凌宗秀. 磷脂肌醇特异的磷脂酶 C 与高血压关系的研究进展[J]. 重庆科大学学报, 2002, 27(3): 364.
- [7] 周建辉, 刘霞, 郝宏. 三磷酸肌醇在高血压发病中的作用[J]. 青岛医药卫生, 2007, 39(1): 54.
- [8] Grimsgaard S, Bonna K H, Jacobsen B K, et al. Plosmu saturated and linoleic fatty acids are independently associated with blood pressure. Hypertension, 1999, 34(3): 478.
- [9] Steinberg H O, Tarshoby M, Monestel R et al. Elevated circulating free fatty acid levels impair endothelium-dependant vasodilation [J]. J Clin Invest, 1997, 100: 1230.
- [10] 王顺, 马爱群. 脂肪酸代谢异常在高血压发病机制中的作用[J]. 国外医学·心血管疾病分册, 2005, 32(3): 80.

[责任编辑 邹晓翠]

R₁ was immersed into rat non-everted gut sac, and the absorption difference was compared. 2-nitrophenol, a metabolic inhibitor, was used to study the influence of energy on the absorption of notoginsenoside R₁. Verapamil, a p-glycoprotein inhibitor, was used to study the influence of p-glycoprotein on the absorption of notoginsenoside R₁. **Result:** The notoginsenoside R₁ concentration in the sac was increasing according to the time. It was obvious that 2-nitrophenol affected the absorption of notoginsenoside R₁. Verapamil had no effect on the absorption of notoginsenoside R₁ in sac system. **Conclusion:** The absorption mechanism of notoginsenoside R₁ might be passive diffusion. Notoginsenoside R₁ might not be the substrate of p-glycoprotein.

[**Key words**] notoginsenoside R₁; non-everted gut sac; absorption; verapamil; 2-nitrophenol

现代药理学研究表明三七皂苷 R₁ 具有明确的抗癌疗效。然而据文献报道,三七皂苷 R₁ 的口服生物利用度不高。药物的生物利用度不高可能由多种因素造成,与药物本身的理化性质、吸收部位等有着密切关系。而 P-蛋白的外排作用也是影响药物生物利用度的因素之一。本实验将通过不翻转小肠囊模型^[1,2]来考察三七皂苷 R₁ 在大鼠小肠中的吸收,并通过加入 P-蛋白抑制剂来考察其是否为三七皂苷 R₁ 的底物。

1 材料

1.1 动物 SD 大鼠,雄性,体重(250 ± 20)g,由第二军医大学实验动物中心提供,动物合格证号:SCXK(沪)2007-0003。

1.2 药品与试剂 三七皂苷 R₁ 对照品(顺勃生物工程技术有限公司提供,纯度 > 98%),三七皂苷 R₁ 实验用品(自提,纯度 > 80%),2-硝基酚(国药集团化学试剂有限公司,100 g),盐酸维拉帕米(上海禾丰制药有限公司,2 mL: 5 mg),乙腈(色谱纯,天津四友试剂公司);甲醇(色谱纯,天津四友试剂公司);试剂用水自制。

1.3 仪器 Agilent 1100 高效液相色谱,Agilent 色谱工作站(Agilent 公司,美国)HYS-H 水浴振荡器(哈尔滨市东联电子技术开发有限公司)

2 方法与结果

2.1 不翻转小肠囊模型的制备 取 SD 大鼠,将颈椎拉断处死,沿腹白线剖开。分别于十二指肠和回肠处切断小肠,用 krebs 液冲洗,至流出液不再浑浊。待小肠洗净后,取 30 cm 空肠,用细线扎成 6 个 5 cm 长的小肠囊,每个小肠囊中注入 0.6 mL 供试液。将处理好的小肠囊各放入盛有 20 mL,37 °C krebs 液的试剂瓶中,通入混合氧气,恒温水浴振荡,37 °C, 50 rpm。每隔 30 min 从试剂瓶中取样 1 次,取样时将小肠囊置于另一装有 20 mL krebs 液的试剂瓶中,

共取样 6 次。样品置 -4 °C 储存,待测。

2.2 三七皂苷 R₁ 的测定 采用反相 HPLC^[3], Discovery C₁₈ 色谱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),流动相 乙腈-水-磷酸(330:670:1),柱温 35 °C,流速 1 mL·min⁻¹;检测波长 203 nm,进样体积 20 μL。空白辅料、krebs 液的色谱图在药物出峰位置未见其他杂质峰,说明对药物测定无干扰。含量测定时峰面积 A 与质量浓度 C(g·L⁻¹)的回归方程为 $A = 10.985C + 0.4861$ ($r = 0.9999$)。线性范围:0.56 ~ 4.48 g·L⁻¹,平均日内差及日间差分别为 0.7% 和 1.1%。

2.3 空白小肠液的收集 雄性 SD 大鼠 3 只,按照 **2.1** 的方法,在每节小肠囊中分别注入 0.6 mL 空白的 krebs 液。将取得的样品用 HPLC 进行测定。结果空白的 krebs 液在小肠囊中恒温振荡 3 h,经 HPLC 检测供试液在 203 nm 下三七皂苷 R₁ 出峰处无吸收。表明空白 krebs 液对测定无影响。

2.4 三七皂苷 R₁ 在小肠黏膜匀浆液中的稳定性 雄性 SD 大鼠 3 只,按照 **2.1** 的方法,截取小肠囊,用冷的生理盐水冲洗干净,再将肠段翻转,用小刀仔细地将小肠黏膜刮下并称重,按照 W:V = 1:5 加入适量冷的空白 krebs 液,用匀浆器进行组织匀浆,得到小肠黏膜组织匀浆混悬液,将此匀浆液高速离心 10 min,取上清液,用于配制供试液。分别用空白 krebs 液和小肠黏膜组织匀浆的上清液配制成三七皂苷 R₁ 浓度为 50 mg·L⁻¹ 的供试液,并于 37 °C 水浴振荡 3 h 后取样。将取得的样品用 HPLC 进行测定。通过测定供试液中三七皂苷 R₁ 的剩余量来进行稳定性考察。结果见表 1,三七皂苷 R₁ 在 krebs 液和小肠黏膜匀浆液中足够稳定(>85% 剩余)。

2.5 药物浓度对吸收的影响 雄性 SD 大鼠 6 只,按照 **2.1** 的方法截取小肠囊,分别加入 50,100,200,800 mg·L⁻¹ 的三七皂苷 R₁ 溶液,比较不同浓度的药物对吸收的影响,以此判断三七皂苷 R₁ 的吸收是否

为被动扩散。结果见图 1,三七皂苷 R_1 的小肠吸收与药物浓度呈线性关系,即可能为自由扩散。

表 1 三七皂苷 R_1 在小肠黏膜匀浆液中的稳定性 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

溶液	三七皂苷 R_1 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	剩余量/%
Krebs(高钾心脏停搏液)	50.3 ± 0.29	100.6 ± 0.58
小肠黏膜匀浆液	51.1 ± 0.31	102.2 ± 0.62

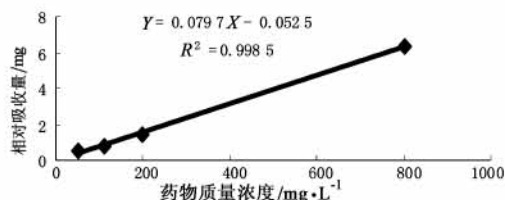


图 1 不同浓度药物对相对吸收量的影响

2.6 能量代谢抑制剂 2-硝基酚的影响 雄性 SD 大鼠 3 只,按照 2.1 的方法截取小肠囊,各加入 $800 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的三七皂苷 R_1 溶液 0.6 mL,将装有小肠囊的试剂瓶平分 2 份,其中 1 份中加入 1 mL 2-硝基酚,判断 2-硝基酚对小肠吸收的作用。见图 2。

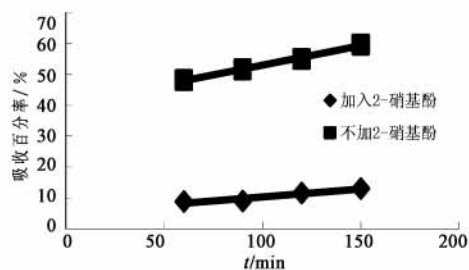


图 2 代谢抑制剂 2-硝基酚的影响 ($n=3$)

2.7 P-蛋白抑制剂维拉帕米对小肠吸收的影响 雄性 SD 大鼠 3 只,按照 2.1 的方法截取小肠囊,在小肠囊中各加入 $800 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的三七皂苷 R_1 溶液 0.6 mL,将装有小肠囊的试剂瓶平分 2 份,其中一份中加入 1 mL 维拉帕米,判断 P-蛋白抑制剂维拉帕米对小肠吸收的作用。由图 3 可知,能量代谢抑制剂 2-硝基酚对三七皂苷 R_1 在小肠的吸收有明显的抑制作用,统计学分析表明有显著差别 ($P < 0.05$)。

3 讨论

溶解状态的三七皂苷 R_1 在大鼠小肠的吸收与药物浓度呈线性关系,但通过实验也发现能量代谢

抑制剂 2-硝基酚对三七皂苷 R_1 在小肠的吸收有明显的抑制作用,提示三七皂苷 R_1 在大鼠小肠中的吸收不是单纯的自由扩散,我们还将通过大鼠在体肠试验及 Caco-2 模型来进一步确定三七皂苷 R_1 的吸收方式。另外,三七皂苷 R_1 在水中的溶解度较小,在一定程度上限制其吸收,这可能是其生物利用度不高的原因之一。因此在设计剂型时可针对这个特点设计缓控释制剂或加入增溶剂提高三七皂苷 R_1 的溶解度。本次试验结果不能证明三七皂苷 R_1 是 P-蛋白的底物,故 P-蛋白对药物的外排作用可能不是造成其生物利用度低的原因。

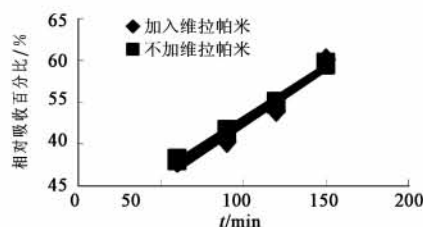


图 3 P-蛋白抑制剂维拉帕米对小肠吸收的影响 ($n=3$)

本次试验是急性离体试验,肠段的状态与体内的真实情况还有很大的不同。因此三七皂苷 R_1 在体内的吸收与本试验结果可能有一定的差异。我们将通过 Caco-2 模型进一步确定三七皂苷 R_1 的吸收机制。

[参考文献]

- [1] 阮丽萍,余伯阳,朱丹妮,等.染料木素的小肠吸收与体内活性相关性的研究[J].中国天然药物,2006,4(4):278.
- [2] YU Bo-yang, RUAN Li-ping, ZHU Dan-ni. The study on the relationship between the intestinal absorption and the in vivo activity of genistein. WFCMS International Symposium on the DDS of TCM and Natural Medicines(世界中联中药与天然药物新型给药系统国际学术研讨会论文集)[C].2005:118.
- [3] 周迎春,赵怀清,梁宁,等.高效液相色谱法同时测定三七总皂苷中人参皂苷 R_{g_1} , R_e , R_{b_1} 与三七皂苷 R_1 含量[J].沈阳药科大学学报,2003,(01):27.

[责任编辑 全燕]